

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Februar 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/13796 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03179
- (22) Internationales Anmeldedatum:
9. August 2001 (09.08.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 40 052.3 11. August 2000 (11.08.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM** [DE/DE]; Geissweg 3, 72076 Tübingen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **AICHER, Wilhelm** [DE/DE]; Hohenzollernstrasse 6/4, 72119 Ammerbuch (DE). **GAY, Steffen** [DE/CH]; Letzistrasse 50, CH-8006 Zurich (CH). **GEORGE, Michael** [DE/DE]; Schleissheimer-Strasse 42, 80333 München (DE). **MÜLLER, Otto** [DE/DE]; Im Heintal 30, 72393 Burladingen (DE). **PAP, Thomas** [DE/DE]; Gellerstrasse 23, 39108 Magdeburg (DE). **PARAK, Wolfgang** [DE/DE]; Hermann-Stockmann-Strasse 65, 85221 Dachau (DE).
- (74) Anwälte: **OTTEN, Hajo** usw.; White, Weller & Partner, Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF PROTON PUMP INHIBITORS FOR TREATING DISEASES OF THE LOCOMOTOR SYSTEM

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PROTONENPUMPEN-HEMMERN ZUR BEHANDLUNG VON ERKRANKUNGEN DES BEWEGUNGSAPPARATES

(57) Abstract: Based on the knowledge that rheumatism and prosthetic loosening fibroblasts and osteoblasts express membrane-bound proton pumps which contribute to bone destruction by acidifying the extracellular medium, the invention provides that diseases of this type are treated with proton pump inhibiting substances and that the determination of the expression of a proton pump of this type is used for diagnostic purposes.

(57) Zusammenfassung: Ausgehend von der Erkenntnis, daß Rheuma- und Prothesenlockerungsfibroblasten sowie Osteoblasten membranständige Protonenpumpen exprimieren, die durch Ansäuerung des extrazellulären Mediums zum Knochenabbau beitragen, wird vorgeschlagen, derartige Erkrankungen durch Hemmstoffe für Protonenpumpen zu behandeln und den Nachweis der Expression einer derartigen Protonenpumpe zu diagnostischen Zwecken zu verwenden.



WO 02/13796 A2

Verwendung von Protonenpumpen-Hemmern zur Behandlung von
Erkrankungen des Bewegungsapparates

Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich mit Erkrankungen des Bewegungsapparates wie z.B. Knochenkrebs (Sarkome...), Osteoarthritis, Osteoporose, Arthritis (einschl. rheumatoider Arthritis), aseptische Prothesenlockerung etc. Insbesondere beschäftigt sich die vorliegende Erfindung mit der Behandlung, der frühzeitigen Diagnose sowie Prävention derartiger Erkrankungen des Bewegungsapparates.

Knochen sind das Stützorgan des Rumpfes und der Extremitäten. Sie sind aus Collagenfasern und Mineralsalzen aufgebaut und unterliegen einem ständigen Umbau. Die Knochenmasse wird in einem physiologischen Gleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau gehalten.

Unter pathologischen Bedingungen wie bspw. der Osteoporose überwiegt dabei der Knochenabbau.

Der Knochen wird von Osteoklasten abgebaut und von Osteoblasten aufgebaut, die dabei zu Osteozyten differenzieren. Die Osteoblasten exprimieren hierzu vor allem das Collagen, andere Matrixproteine und Enzyme zur Mineralisierung, wie beispielsweise die alkalische Phosphatase. Osteoklasten setzen dagegen neben matrixabbauenden Proteasen wie z.B. Cathepsin auch Säure frei, indem sie hierfür eine spezifische ATPase exprimieren, die Protonen ins perizelluläre Milieu abgibt. Diese "Protonenpumpe" weist eine Homologie zu lysosomalen Protonenpumpen und entsprechenden Enzymen in Nierenzellen auf.

Rheumatoide Arthritis ist eine chronische entzündliche Autoimmunkrankheit, deren Pathogenese größtenteils unbekannt ist. Eine charakteristische Eigenschaft von rheumatoider Arthritis und aseptischer Prothesenlockerung ist die Knochenresorption durch hyperplastisches fibröses Gewebe. Man geht heute davon aus, daß aktivierte fibroblastenartige Zellen in der Pathogenese von pathologischen Zuständen eine wichtige Rolle spielen, bei denen die extrazelluläre Matrix durch ein entzündetes und hyperplastisches fibröses Gewebe degradiert wird. Es ist bekannt, daß synoviale Fibroblasten relevante matrixabbauende Enzyme exprimieren und Faktoren freisetzen, die die Aktivität von Osteoklasten verstärken und die Differenzierung von Makrophagen in Osteoklasten erleichtern.

Müller-Ladner et al., Am J Pathol (1996) Band 149, 1607-1615 beschreiben in diesem Zusammenhang, daß synoviale Fibroblasten der rheumatoiden Arthritis progressiv Gelenkknor-

pel zerstören, wenn sie in SCID-Mäuse koimplantiert werden, die ein Tiermodell für rheumatoide Arthritis darstellen. Fibroblasten von osteoarthritischen Patienten oder Hautfibroblasten zeigen ein derartiges Verhalten nicht.

Darüber hinaus sind aktivierte synoviale Fibroblasten der rheumatoiden Arthritis Effektorzellen, die matrixabbauenden Proteasen wie Collagenase, Stromelysin und Cathepsin im Vergleich mit anderen Fibroblasten mit erhöhtem Spiegel exprimieren. Es ist bekannt, daß für eine optimale Cathepsin-Aktivität ein saures pH-Milieu erforderlich ist. In der Literatur wird davon ausgegangen, daß Makrophagen oder Osteoklasten für die Protonenproduktion in Zusammenhang mit Knochenabbau oder -umbau verantwortlich sind; siehe Väänänen, in: Bilezikian, Raisz and Rodan (ed.): Principles of Bone Biology, Acad. Press, San Diego, USA, 1996, Seiten 103-114.

Parak et al, Abstract S17, Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 23. - 26. September 1998, konnten darüber hinaus zeigen, daß aktivierte synoviale Fibroblasten, die von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) isoliert worden waren, durch metabolische Aktivierung Säure produzieren können. Die Mechanismen der Säureproduktion wurden nicht beschrieben. Die Autoren berichten über Messungen mit einem Zytosensor-Mikrophysiometer, aus denen hervorging, daß native synoviale Fibroblasten saure metabolische Produkte exkretieren, wenn sie durch Zytokine, Phorbol ester oder Ionomycin angeregt werden.

Obwohl die Pathogenese von rheumatoider Arthritis und aseptischer Prothesenlockerung sich merklich unterscheidet, ist die progressive Zerstörung von Knochen durch ein fibroproliferati-

ves Gewebe ein gemeinsames Merkmal beider pathologischer Zustände. Darüber hinaus gibt es Ähnlichkeiten in der Morphologie zwischen dem hyperplastischen Synovium in rheumatoider Arthritis und der Grenzmembran, die sich bei aseptischer Prothesenlockerung zwischen der Prothese und dem Knochen ausbildet; Pap et al., Arthr. Rheum., 1999, Band 42, A501. Die Autoren berichten, daß aktivierten Prothesenlockerungs-Fibroblasten (PLF) in SCID-Mäusen Knochen in vivo ohne die Hilfe von Osteoklasten resorbieren können und nach Stimulierung von Ionomycin schnell saure Komponenten freisetzen.

Die WO 89/03829 schlägt Omeprazol als Hemmstoff der Osteoporose vor, um den Einbau von Kalcium in das Skelett zu erhöhen.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, therapeutische sowie diagnostische Maßnahmen und Mittel bereitzustellen, um die oben angesprochenen pathologischen Zustände behandeln bzw. frühzeitig erkennen zu können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch die Verwendung von Hemmstoffen für Protonenpumpen zur Behandlung von Erkrankungen oder pathologischen Zuständen des Bewegungsapparates, die mit Osteoblasten, Fibroblasten und/oder fibroblastenartigen Zellen assoziiert sind. Ferner wird die Erfindung gelöst durch die Verwendung eines Mittels, das zum Nachweis der Expression einer Protonenpumpe in Fibroblasten, Osteoblasten und/oder fibroblastenartigen Zellen dient, in der Diagnose von Erkrankungen oder pathologischen Zuständen des Bewegungsapparates.

Ferner wird die Erfindung gelöst durch ein diagnostisches Mittel zum Nachweis der pathologisch veränderten Expression einer

Protonenpumpe in Fibroblasten, fibroblastenartigen Zellen und/oder Osteoblasten, das zumindest ein Nukleinsäuremolekül enthält, das mit einem Abschnitt eines für die Protonenpumpe kodierenden Genes hybridisiert.

Das Gen kann dabei eine Primärtranskript-RNA (hnRNA) oder eine prozessierte mRNA sein, es ist aber z.B. auch denkbar, Antikörper gegen diese Genprodukte und/oder die Protonenpumpe zum Nachweis zu verwenden.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung konnten nämlich erstmals zeigen, daß PLF bei Anregung große Mengen an Säurekomponenten freigeben, die zu der Fähigkeit der PLF beitragen, Knochen vor dessen Abbau zu Dekalzifizieren (Entkalken) und gleichzeitig Kollagenfasern so zu verändern, daß sie leichter löslich und damit durch Kollagenasen abbaubar sind.

Die Erfinder konnten weiter zeigen, daß aktivierte synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie Prothesenlockerungs-Fibroblasten eine mRNA für eine Protonenpumpe exprimieren. Diese Protonenpumpe wurde ebenfalls in Osteoblasten gefunden. Dieser erstmals den Erfindern gelungene Nachweis einer Protonenpumpe auf diesen mesenchymalen Zellen hat überraschende Auswirkungen auf die Behandlungs- und Diagnosemöglichkeiten vieler Erkrankungen des Bewegungsapparates.

Die Erfinder konnten zeigen, daß die membranständig exprimierte Protonenpumpe durch bestimmte Protonenpumpen-Hemmer inhibiert

werden kann. Die ohne den Einsatz der Protonenpumpen-Hemmer erfolgte Ansäuerung des extrazellulären Mediums geht nämlich nach Zugabe eines Protonenpumpen-Hemmers innerhalb kürzester Zeit signifikant zurück. Dies zeigt nicht nur, daß die extrazelluläre Ansäuerung durch die Protonenpumpe bewirkt wird, sondern weiter, daß es sich um eine membranständige Protonenpumpe handelt. Würde die extrazelluläre Ansäuerung durch einen Transportprozeß aus dem Inneren der PLF heraus bedingt, würde die Wirkung der Inhibierung nämlich deutlich langsamer vonstatten gehen, als bei einer membranständigen Protonenpumpe, die einen extrazellulären pH-Gradienten aufbaut.

Bisher wurde im Stand der Technik davon ausgegangen, daß Fibroblasten zum Knochenabbau allein dadurch beitragen können, daß sie Zytokine exprimieren, die die Differenzierung von Makrophagen in Osteoklasten fördern können. Parak et al. a.a.O. sowie Pap et al. a.a.O. beschreiben lediglich, daß Säurefreisetzung gemessen wurde, sie spekulieren jedoch, daß eine metabolische Aktivierung, also bspw. eine vermehrte Glykolyse dafür verantwortlich ist. Sie gehen damit wie andere Autoren davon aus, daß die bei mesenchymalen Zellen beobachtete perizelluläre Ansäuerung durch Stoffwechselprodukte der Glykolyse hervorgerufen wird.

Aus ihren Ergebnissen leiten die Erfinder nun die überraschende Erkenntnis ab, daß die Säureproduktion durch Exprimierung einer Protonenpumpe bei Fibroblasten, fibroblastenartigen Zellen und/oder Osteoblasten eine wichtige Rolle bei den eingangs erwähnten Erkrankungen des Bewegungsapparates spielt und Ansatzpunkt für Therapie und Diagnostik sein kann. Im weiteren werden

unter "Fibroblasten" auch "fibroblastenartige Zellen" verstanden.

Die erwähnten Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu der bisherigen wissenschaftlichen Lehrmeinung, wie sie beispielsweise Teitelbaum in Science (2000), Band 289, Seiten 1504-1508 zusammenfaßt. Die Knochenresorption ist danach einzig und allein Funktion der Osteoklasten, die gemäß diesem Review-Artikel vorrangiges Ziel bei der Behandlung von Osteoporose sind.

Auch die WO 99/66910 beschreibt Osteoklasten als Ansatzpunkt für Therapien zur Verhinderung von Knochenresorption.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben jedoch erkannt, daß auch die in viel größerer Zahl als Osteoklasten vorhandenen und zudem langlebigeren Osteoblasten sowie die Fibroblasten zum Knochenabbau beitragen können, so daß diese mesenchymalen Zellen überraschenderweise einen hervorragenden Angriffspunkt für die Behandlung von Erkrankungen oder pathologischen Zuständen des Bewegungsapparates darstellen.

Vor diesem Hintergrund betrifft die Erfindung auch die Verwendung von Substanzen, um die Expression oder Funktion einer vorzugsweise membranständig exprimierten Protonenpumpe in Fibroblasten und Osteoblasten zu inhibieren, die mit pathologischen Prozessen insbesondere des Bewegungsapparates, wie Matrixabbau, rheumatoider Arthritis, aseptischer Prothesenlockerung (APL), Osteoporose etc. assoziiert sind. Die Erfindung ist dabei nicht auf pathologische Prozesse des Bewegungsapparates beschränkt, sondern bezieht sich allgemein auf Mechanismen, die

extrazelluläre Matrix einschließen. Dies wird durch die Tatsache getragen, daß Fibroblasten im Körper ubiquitär vorkommen.

Da z.B. das RA-Synovium gut gegenüber umgebendem Gewebe abgeschlossen ist, ist insbesondere hier eine direkte Applikation von sogenannten "Protonenpumpen-Hemmern" möglich.

Der Nachweis der Expression einer derartigen Protonenpumpe durch z.B. PCR-Primer im Rahmen einer frühzeitigen Diagnostik und/oder Prävention ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Dies ist vor dem Hintergrund zu sehen, daß eine Protonenpumpe (V-ATPase), die von synovialen Fibroblasten oder Prothesenlockerungs-Fibroblasten exprimiert wird, an den genannten pathologischen Zuständen beteiligt ist.

Als Hemmstoffe für die H^+ -ATPase (V-ATPase genannt) kommen vorrangig in Frage: Bafilomycin A1, Amilorid, KNO_3 , N-Ethyl-Maleinimid, Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), Diethylstilböstrol, Tributylzinn, anti-sense Nukleinsäuremoleküle, Peptide.

Die US 5,821,265 erwähnt hier lediglich die Möglichkeit, Protonenpumpen in Osteoklasten durch Metall-EDTA-Komplexe zu blockieren.

Die Erfinder konnten durch RT-PCR die mRNA für beta $1H^+$ -ATPase nachweisen. In synovialen Fibroblasten oder Prothesenlockerungs-Fibroblasten ließen sich sehr hohe Spiegel dieser mRNA nachweisen, so daß Mittel zum Nachweis dieser mRNA bzw. der noch unprozessierten hnRNA geeignet sind, als diagnostisches Mittel zum Nachweis der eingangs genannten pathologischen Zustände verwendet zu werden. Selbstverständlich ist es nicht zwingend erforderlich, eine reverse Transkriptase-

Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchzuführen, es können auch SONDENSEQUENZEN verwendet werden, die an die mRNA bzw. die hnRNA hybridisieren.

Geeignete Primer für den PCR-Nachweis der Protonenpumpe haben folgende Sequenzen:

Oberer Primer: 5'-TGA CTT TGA GCA GAA TGG AAC C-3' SEQ-ID Nr. 1

Unterer Primer: 5'-CCC TCG CGG GAA TAG AAC T-3' SEQ-ID Nr. 2

Mit Hilfe dieser Primer konnte nachgewiesen werden, daß Rheuma- und Prothesenlockerungs-Fibroblasten mRNA für die Beta-Untereinheit von humaner H⁺-ATPase (ATP6B1, Genbanknummer NM_001692) exprimieren.

Vor diesem Hintergrund betrifft die Erfindung auch die Verwendung dieser Primer für diagnostische Zwecke.

Die Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuremoleküle, die an ein Nukleinsäuremolekül binden, das unter stringenten Bedingungen mit den beiden oben erwähnten Primern hybridisiert. Hierbei wird von der Erkenntnis ausgegangen, daß auch unter stringenten Bedingungen an die mRNA bzw. hnRNA hybridisierende Nukleinsäuremoleküle als Primer verwendet werden können, die in der Sequenz zwar von den oben erwähnten Primern abweichen, aber dieselbe Primer-Bindungsstelle an der RNA aufweisen. Darüber hinaus ist es auch möglich, daß die Primer lediglich Bestandteil eines längeren RNA-Moleküls sind, das am 3'- und/oder 5'-Ende weitere Nukleotide aufweist, die zu den entsprechenden Nukleotiden in der Ziel-RNA komplementär sind.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung derartiger Nukleinsäuremoleküle auf DNA- und/oder RNA-Ebene im Rahmen einer Therapie. Als sogenannte anti-sense Nukleinsäuremoleküle können sie nämlich an die DNA bzw. RNA in den betroffenen Zellen binden und so die Transkription, die Prozessierung und/oder die Translation und damit die Expression der betreffenden Protonenpumpe inhibieren.

Diese Funktion kann auch durch entsprechende Peptide erreicht werden, die entweder an die kodierende DNA, die hnRNA oder mRNA binden, oder aber unmittelbar an das synthetisierte Protein, um auf diese Weise die Expression der Protonenpumpe auf der Membran der Fibroblasten zu verhindern.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß ausgehend von der Erkenntnis, daß an RA oder APL beteiligte Fibroblasten membranständige Protonenpumpen exprimieren, Mittel und Maßnahmen bereitgestellt wurden, um pathologische Zustände des Bewegungsapparates nicht nur therapieren sondern auch frühzeitig diagnostizieren zu können. Die Diagnose beruht dabei auf dem frühen Nachweis eines hohen Spiegels von hnRNA oder mRNA, die zur Expression der Protonenpumpe führt. Die Therapie kann in einem frühen Stadium ebenfalls bei mRNA oder der hnRNA, aber auch bereits bei der kodierenden DNA angreifen, um die Expression der Protonenpumpe zu verhindern. Darüber hinaus ist es auch möglich, sogenannten Protonenpumpen-Hemmer einzusetzen, um die Funktion bereits exprimierter Protonenpumpen zu inhibieren.

Diese Inhibierung entweder der Expression oder der Funktion der Protonenpumpen auf den genannten Fibroblasten oder auf Osteoblasten erreicht den gewünschten therapeutischen Effekt des-

halb, weil dadurch die Ansäuerung des extrazellulären Mediums vermindert und somit die Voraussetzungen beseitigt werden, die den Matrixabbau erst ermöglichen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sowohl die FLS (Fibroblast Like Synoviocytes) als auch Prothesenlockerungsfibroblasten die Fähigkeit besitzen, Knorpel und Knochen ohne die Hilfe von Osteoklasten zu resorbieren.

Fibroblasten exprimieren sowohl bei RA als auch bei APL Enzyme, die an der Knochenresorption beteiligt sind. Die erforderliche Dekalzifizierung der Knochenmatrix vor dem Abbau bewirken die Fibroblasten dadurch, daß sie durch die gefundene Protonenpumpe den perizellulären pH-Wert signifikant absenken. Auf diese Weise können aktivierte fibroblastenartige Zellen in pathologischen Zuständen wie RA oder APL direkt zu diesen Zuständen beitragen, so daß sie nach Erkenntnis der Erfinder neue Angriffspunkte sind, um Knochenresorption in pathologischen Zuständen frühzeitig erkennen und therapieren zu können.

Weitere Merkmale und Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung im Zusammenhang mit den beigefügten Figuren.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die wesentlichen Merkmale der vorliegenden Erfindung werden jetzt nachstehend anhand von Beispielen näher erläutert.

- Fig. 1 zeigt anhand einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung den Abbau von Knochen durch Prothesenlockerungsfibroblasten (PLF); wenn PLF mit normalem humanem Knochen- gewebe in SCID-Mäusen implantiert wird, lagert es sich an die Knochenmatrix an und dringt tief in sie ein (A, Verstärkung x630); kleine Knochenstücke werden sogar durch die Fibroblasten umgeformt (B, Verstär- kung x630); bei Co-Implantation mit PLF werden so- wohl Knorpel als auch Knochen zerstört (C, Verstär- kung x630);
- Fig. 2 zeigt, daß PLF bei Stimulierung mit TNF-alpha große Mengen an sauren Komponenten freigeben; PLF wurden auf Polycarbonat-Membranschälchen ausgesät und die perizelluläre Ansäuerung unter Verwendung eines Zytosensormikrophysiometers gemessen; die Stimulie- rung mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- alpha führte zu einer schnellen Ansäuerung des peri- zellulären Milieus; bei Stimulierung mit 10 ng/ml rekombinantem humanem TNF-alpha erreichte die Ansäu- erung nach 20 Minuten einen Spitzenanstieg von 15 %;
- Fig. 3 zeigt eine vergleichbare Kurve wie in Fig. 2, jedoch für RA-FLS; die Ansäuerung erreichte ihre maximale Zunahme von 60 % bei einer Stimulierung bereits mit 1 ng/ml TNF-alpha;
- Fig. 4 zeigt eine vergleichbare Kurve wie in Fig. 3, jedoch für frühpassagige Osteoblasten;

- Fig. 5 zeigt in einer Darstellung ähnlich Fig. 2 die maximale Änderung der Ansäuerung in Prozent für die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen der Protonenpumpenhemmer Amilorid und Bafilomycin für PLF;
- Fig. 6 zeigt den Zeitverlauf der Änderung der Ansäuerung für PLF ohne, mit und wieder ohne Zugabe von 50 μM Amilorid; die Zugabe erfolgte zwischen ca. 26 min. und ca. 48 min.;
- Fig. 7 zeigt in einer Darstellung wie Fig. 6 den Zeitverlauf der Änderung der Ansäuerung für PLF bei Zugabe von 1 μM Bafilomycin zwischen 40 und 75 min.

Beispiel 1: Isolation von fibroblastenartigen Zellen

Von zwei Patienten mit RA wurden Gewebeproben im Rahmen einer Synoviorthese entnommen. Normales synoviales Gewebe wurde im Rahmen einer Autopsie von Individuen ohne arthritische Vorgeschichte entnommen.

Gewebeproben von der synovialen Grenzmembran um lose, einzementierte Hüftgelenksprothesen wurden von fünf Patienten bei einer Kontrolloperation entnommen.

Normales humanes Knochengewebe und Gelenkknorpel wurden vom Oberschenkelkopf eines Unfallpatienten entnommen.

Alle Gewebeproben wurden zerkleinert und mit Dispase I über Nacht enzymatisch verdaut. Die freigesetzten Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium, Life Technologies,

Inc.) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Gemini G Biological Products, Callabasa, CA) in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ gezüchtet. Nach Inkubation über Nacht wurden nicht-adhärenzte Zellen entfernt und die adhärenzten Zellen viermal passagiert. Durch ELISA wurde bestätigt, daß die Kulturüberstände frei von Mycoplasmen waren.

Beispiel 2: Knochen- und Knorpelabbau im SCID-Maus-Modell

Um das aggressive Verhalten der in Beispiel 1 aufbereiteten RA-FLS (fibroblastenartige Synoviozyten von Patienten mit rheumatoider Arthritis) und PLF (Prothesenlockerungsfibroblasten) zu untersuchen, wurde das SCID-Maus-Co-Implantationsmodell verwendet. Bei diesem Modell werden humane fibroblastenartige Zellen zusammen mit normalem humanem Knochengewebe und Gelenkknorpeln in Mäuse mit schwerem kombiniertem Immundefekt (Severe Combined Immunodeficiency: SCID) implantiert und dort für 60 Tage belassen. Da die SCID-Mäuse die humanen Transplantate nicht abstoßen, erlaubt dieses Modell die Untersuchung der Invasion der fibroblastenartigen Zellen in das co-implantierte Knochengewebe und Gelenkknorpel in Abwesenheit von humanen entzündlichen Zellen.

Zwei Wochen alte, weibliche SCID-Mäuse (Charles Rivers GmbH, Sulzfeld, Deutschland) wurden permanent unter keimfreien Bedingungen gehalten.

Die Co-Implantation von fibroblastenartigen Zellen zusammen mit Knochengewebe und Gelenkknorpeln erfolgte nach dem von Müller-Ladner a.a.O. beschriebenen Verfahren.

Kurz gefaßt wurden 10^5 Zellen nach Trypsinisierung, Waschen und Zentrifugieren in 100 μ l sterilem Kulturmedium aufgenommen und zusammen mit einem 1 mm³ großen Stück normalen Knochengewebes und Gelenkknorpeln in die Kavität eines sterilen Tupfers gegeben. Die Mäuse wurden anästhesiert und die linke Niere freigelegt, woraufhin nach einem kleinen Einschnitt ein Implantat unter die Nierenkapsel plaziert wurde. Daraufhin wurden die peritoneale Schicht und die Haut vernäht. Nach 60 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Implantate entfernt. Das Gewebe wurde in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

In Fig. 1 sind Schnitte der Explantate nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung gezeigt.

In Fig. 1A ist zu erkennen, daß die PLF sich an die Knochenoberfläche angelagert und den Knochen resorbiert hatten. In allen untersuchten Proben wuchsen die PLF um die Knochenstücke herum und erzeugten klare Resorptionsbereiche.

In Fig. 1B ist zu erkennen, daß kleine Teile des Knochens durch die aggressive PLF sogar umgeformt wurden. In Fig. 1 ist zu erkennen, daß die Implantation von sowohl Knorpel- als auch Knochenstücken zur Zerstörung beider Implantate führte.

Durch immunhistochemische Verfahren konnte gezeigt werden, daß die in den Knochen und den Korpel eingedrungenen fibroblastenartigen Zellen humanen Ursprungs waren. In keiner der Proben wurden an den Stellen der Knochenresorption osteoklastenartigen murine Zellen gefunden.

Beispiel 3: Extrazelluläre Ansäuerung durch aktivierte Fibroblasten und Osteoblasten

Um die Fähigkeit von PLF und RA-FLS zu untersuchen, saure Komponenten freizusetzen, wurden ultrasensitive pH-Messungen in der direkten perizellulären Umgebung mit einem Zytosensor-Mikrophysiometer (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, US) durchgeführt. Dieses Gerät umfaßt einen hochsensitiven pH-Sensor, der auf dem lichtadressierbaren potentiometrischen Sensor (LAPS) beruht und ein rechnergesteuertes Perfusionssystem enthält; siehe bspw. Hafeman et al., Science 1998, Band 240, Seiten 1182-1185; Parce et al., Science 1989, Band 246, Seiten 243-247; McConnell et al., Science 1992, Band 257, Seiten 1906-1912; sowie Uwicka et al., Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994, Band 23, Seiten 87-113.

Dieses Gerät erlaubt die Detektion der Protonenproduktion im perizellulären Medium, während die Zellen in Membranschälchen wachsen, die auf einem Zytosensorchip positioniert sind, der verwendet wird, um die Ansäuerung zu messen.

PLF und RA-FLS wurden in Polycarbonat-Membranschälchen (Transverse 3402, Porengröße 3 μm , Corning Costar, Bodenheim, Deutschland) zwei Tage vor den Experimenten bei einer Anfangsdichte von 3×10^5 Zellen/ml in 1 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS pro Membranschälchen ausgesät.

Um die Protonenabgabe zu analysieren, wurden die Zellen durch zyklische Zugabe von Medium mit rekombinantem humanem TNF-alpha (30 U/ml, Roche Biochemicals, Roche, Basel, Schweiz), Ionomycin (10 mg/ml, Biomol, Hamburg, Deutschland), oder Kontrollmedium

aktiviert. Bei den Ionomycin-Messungen enthielt das Kontrollmedium DMSO.

Nach 90 Sekunden wurde der Zufluß gestoppt, und die Ansäuerung wurde als Antwort der Zellen auf die Stimulierung über einen Zeitraum von 30 Sekunden gemessen. Die Ansäuerungsrate wurde gemessen als maximale Ansäuerung r_{\max} pro Zyklus, normiert auf den Gleichgewichtswert r_{eq} und für jede Probe in Prozent berechnet. Auf diese Weise entspricht 100 % einer fehlenden Antwort und größere Werte entsprechen einer Ansäuerung.

Nach den Experimenten wurden die Schälchen entfernt und die Zellen mit Comassie-Blau angefärbt, um die gleichmäßige Verteilung der Zellen während der Messung zu zeigen.

Eine Stimulierung von PLF mit einem kalziumabhängigen Signal, wie es durch die Zugabe von Ionomycin induziert wird, führte zu einer schnellen und signifikanten Freigabe von sauren Komponenten. Dies wurde anhand einer Zunahme in der Ansäuerungsgeschwindigkeit um 5 % nach 20 Minuten erkannt.

Eine Stimulierung von PLF mit TNF-alpha bei verschiedenen Konzentrationen zeigte noch stärkere Effekte. Während eine Inkubation der PLF mit 1 ng/ml TNF-alpha nicht zu einer signifikanten Stimulierung der PLF führte, ergab die Zugabe von 10, 100 bzw. 300 ng/ml TNF-alpha eine substantielle Ansäuerung des perizellulären Milieus. Wie in Fig. 2 zu erkennen, ergab sich die maximale perizelluläre Ansäuerung von 15 % bei 10 ng/ml TNF-alpha nach 20 Minuten. Eine weitere Erhöhung der TNF-alpha-Konzentration führte nicht zu einem verstärktem Effekt.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis vergleichbarer Messungen an RA-FLS. Es ergab sich bei einer TNF-alpha-Konzentration von 1 ng/ml eine Zunahme der perizellulären Ansäuerung von 60 %, eine weitere Erhöhung der TNF-alpha-Konzentration führte zu keiner weiteren Zunahme der Ansäuerung.

Eine vergleichbare extrazelluläre Ansäuerung wurde wie folgt auch bei Osteoblasten festgestellt:

Osteoblasten wurden vom trabekulären Knochen von drei Patienten isoliert. Der Knochen wurde in kleine Schnitte geschnitten, die Stücke wurden mit PBS gewaschen und in PBS/Collagenase (Typ VII, 1700 U/ml, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Stücke wurden sedimentiert, gewaschen und in vollständigem DMEM-Medium mit 10 % FCS, Antibiotika und Wachstumsfaktoren inkubiert, wie beschrieben bei Parak et al., J. Rheumatol (2000), Band 27, Seiten 2312-2322.

Die Osteoblasten wurden in Monolayer-Kulturen expandiert. Um die Zelllinie zu bestätigen, wurde die Expression von Osteocalcin durch Immunhistochemie detektiert.

Für Messungen im Zytosensormikrophysiometer wurden die Zellen von konfluenten Kulturen unter Verwendung von Trypsin/EDTA (Life Technologies Eggenstein, Deutschland) geerntet, in mit 1 % FCS angereichertem PBS gewaschen und gezählt.

Die Osteoblasten wurden auf Polycarbonat-Membranschälchen (Transwells 3402, Porengröße 3 µm, Corning Costar, Corning, USA) zwei Tage vor den Experimenten mit einer Anfangsdichte von

300.000 Zellen/ml in 1 ml vollständigem DMEM-Medium pro Membranschälchen ausgesät. Um mit dem in dem Medium vorhandenen FCS assoziierte Serumartefakte zu vermeiden, wurden die Zellen gewaschen und vor der Untersuchung in serumfreiem Medium für 24 Stunden inkubiert.

Um die Protonenabgabe zu analysieren, wurde den Zellen wie oben $\text{TNF-}\alpha$ zugegeben und die Ansäuerungsrate gemessen.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer derartigen Messung für frühpassagige Osteoblasten. Bei $\text{TNF-}\alpha$ Konzentrationen von 10-100 ng/ml reagieren die Osteoblasten mit einer um 20 bis ungefähr 35 % erhöhten Protonensekretion, bei geringeren Konzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$ steigt die Ansäuerungsrate um etwa 20 %.

Beispiel 4: Nachweis einer membranständigen Protonenpumpe

Um den potentiellen Mechanismus zu identifizieren, der für die Freigabe von sauren Komponenten durch PLF verantwortlich ist, wurde die Expression der humanen H^+ -transportierenden ATPase durch RT-PCR und nichtradioaktive in situ Hybridisierung untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Expression der mRNA für die 58 kDa beta 1 Untereinheit (ATP6B1, GenBank Zugangs-Nr. NM 001692) der humanen v-ATPase untersucht und zu diesem Zweck die folgenden, spezifischen Primer entworfen:

Oberer Primer: 5'-TGA CTT TGA GCA GAA TGG AAC C-3' SEQ-ID Nr. 1

Unterer Primer: 5'-CCC TCG CGG GAA TAG AAC T-3' SEQ-ID Nr. 2.

Die gesamte RNA von kultivierten PLF wurde nach den Vorschriften des Herstellers unter Verwendung des TRIzol^(R)RNA-Isolationskits (Gibco-BRL) extrahiert. Nach der Erststrang cDNA-Synthese unter Verwendung von Oligo-d (T)₁₂₋₁₂ Primern und M-MuLV reverse Transkriptase (Roche Mannheim) wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Taq^(R)DNA-Polymerase (Stratagene) durchgeführt.

Die Amplifizierung erfolgte über 34 Zyklen jeweils bei 60°C für eine Minute und 72°C für zwei Minuten. Das PCR-Produkt wurde dann in den pPCR-ScriptAmp SK + Vektor (Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers ligiert. Nach der Transformation von Epicurian Coli^(R) XL1-Blue MRF'Kan superkompetenten Zellen und Selektion von Klonen erfolgte eine Großmaßstabspräparation unter Verwendung des Qiagen MaxiPrep Kit (Qiagen). Um die Identität der klonierten cDNA-Fragmente zu bestimmen, wurde eine kommerzielle Dideoxi-Sequenzierung durchgeführt.

Die PCR führte zur Verstärkung von cDNA-Fragmenten der erwarteten 786 Basenpaare von ATP6B1 für alle PLF-Proben mit hundertprozentiger Übereinstimmung der Sequenz der klonierten Fragmente mit der veröffentlichten Genbanksequenz (NM 001692).

Die Expression der ATP6B1 wurde durch nichtradioaktive in situ Hybridisierung der SCID-Mausschnitte unter Verwendung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden bestimmt.

Die wie oben beschrieben klonierten cDNA-Fragmente wurden durch Plasmidpräparation gewonnen und zur Erzeugung von Templates für die Hybridisierung mit BamH1 und Mot1-Restriktionsenzymen linearisiert.

Anti-sense und sense RNA-Sonden wurden durch in vitro Transkription mit T3- und T7-RNA-Polymerase und einem kommerziell verfügbaren Transkriptionskit (Stratagene) erhalten und mit Digoxigenin-UTP (Roche Mannheim) markiert.

Die in situ Hybridisierung der Explantat-Schnitte mit den so gewonnenen Sonden erfolgte wie bei Kriegsmann et al. beschrieben. Nach der Prähybridisierung wurden die Schnitte über Nacht bei 52°C mit den Digoxigenin-markierten RNA-anti-sense-Sonden inkubiert. Ungebundene Sonden wurden bei 37°C für 45 Minuten mit 10 µg/ml RNase (Roche Mannheim) verdaut, woraufhin die Schnitte bei 50°C für fünf Minuten mit SSC/Formamid gewaschen wurden. Anschließend folgten vier abgestufte SSC/SDS-Bäder bei 50°C für jeweils 15 Minuten. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungen mit 2 % Pferd-Normalserum wurden die hybridisierten Sonden unter Verwendung von Anti-Digoxigenin Fab-Fragmenten detektiert, die an alkalische Phosphatase und NBT/BCIB-Substrat (Roche Mannheim) gekoppelt waren. Negative Kontrollexperimente wurden unter Verwendung der entsprechenden Sense-Sonden durchgeführt.

Auf diese Weise konnte die Expression der mRNA für die 58 kDa beta 1 v-ATPase Untereinheit in PLF an Stellen der Knochenresorption in den SCID-Maus-Proben gezeigt werden.

Auch hier konnte durch immunhistochemische Verfahren mit einem Antikörper bestätigt werden, daß die positiven Zellen humanen Ursprungs waren, also nicht aus der Maus selbst stammten.

Um zu zeigen, daß die humane v-ATPase auf der äußeren Zellmembran der PLF exprimiert wird, wurde eine Immun-

Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Wie erwartet, konnte die intrazelluläre Expression der humanen v-ATPase in allen PLF gezeigt werden. Es gab jedoch ebenfalls eine klare Anfärbung auf der Zelloberfläche der PLF, was die Expression der v-ATPase nicht nur innerhalb der PLF sondern auch auf der äußeren Zellmembran zeigt. Diese Daten wurden sowohl durch die Immun-Gold- als auch die Diaminobenzidin-Methode bestätigt.

Beispiel 5: Inhibierung der Protonenpumpe

Um den funktionellen Beitrag der membranständigen v-ATPase auf die Freigabe von sauren Komponenten durch die PLF zu testen, wurden die Wirkungen von ATPase-Inhibitoren auf die perizelluläre Ansäuerung im Zytosensormikrophysiometer untersucht.

Zu diesem Zweck wurden sowohl der ATPase-Inhibitor Amilorid, der bei höheren Konzentrationen auch die v-ATPase inhibiert, als auch der spezifische v-ATPase-Inhibitor Bafilomycin A1 bei verschiedenen Konzentrationen verwendet, um den Zeitverlauf der H^+ -Freigabe verglichen mit unbehandelten PLF zu analysieren.

Amilorid wurde in Konzentrationen zwischen 200 μM und 1 mM, Bafilomycin A1 in Konzentrationen zwischen 10^{-8} und 10^{-5} M eingesetzt. Nach 90 Sekunden wurde der Zufluß gestoppt und die Ansäuerung als Antwort der Zellen für einen Zeitraum von 30 Sekunden gemessen; Fig. 5 zeigt einige konzentrationsabhängige Werte der Ansäuerung in Prozent.

Die Zugabe von Amilorid verringerte die perizelluläre Ansäuerung um bis zu 40 %, was sich aus einer signifikanten Abnahme des perizellulären pH-Wertes ergab. Das Plateau maximaler Inhibierung der H^+ -Freigabe wurde schon nach 15 Minuten erreicht und blieb über der gesamten Meßzeit von 45 Minuten ohne weitere Zunahme stabil. Fig. 6 zeigt beispielhaft die Reaktion auf 50 μ Amilorid mit einer ca. 10%igen Abnahme der Ansäuerung nach wenigen Minuten.

Die Zugabe von Bafilomycin A1 führte zu einer Inhibierung der perizellulären Ansäuerung bei Konzentrationen von 10^{-6} M von ungefähr 10 %. Auch dieser Effekt wurde schon 15 Minuten nach Zugabe von Bafilomycin A1 beobachtet; siehe Fig. 7

Auch aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß die extrazelluläre Ansäuerung auf einem Membran-assoziierten Mechanismus, also der membranständigen Protonenpumpe beruht und nicht auf einem langsamen Transport aus dem Inneren der Zelle.

Patentansprüche

1. Verwendung von Hemmstoffen für Protonenpumpen zur Behandlung von Erkrankungen oder pathologischen Zuständen des Bewegungsapparates, mit denen Osteoblasten, Fibroblasten und/oder fibroblastenartige Zellen assoziiert sind.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Erkrankungen des Bewegungsapparates umfassen: Knochenkrebs, Osteoarthrose, Osteoporose, Arthritis, rheumatoide Arthritis, aseptische Prothesenlockerung.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Protonenpumpe membranständig exprimiert ist und einen extrazellulären pH-Gradienten aufbaut.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Hemmstoff ausgewählt ist aus der Gruppe: Bafilomycin A1, Amilorid, KNO_3 , N-Ethyl-Maleinimid, Dicyclohexylcarbodiimid, Diethylstilböstrol, Tributylzinn, anti-sense Nukleinsäuremoleküle, Plasmide.
5. Nukleinsäuremolekül mit der Sequenz "Oberer Primer" (SEQ-ID Nr. 1)

5'-TGA CTT TGA GCA GAA TGG AAC C-3'.

6. Nukleinsäuremolekül mit der Sequenz "unterer Primer" (SEQ-ID Nr. 2)

5'-CCC TCG CGG GAA TAG AAC T-3'.

7. Nukleinsäuremolekül, das an ein Nukleinsäuremolekül bindet, das unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül aus Anspruch 5 oder 6 hybridisiert.
8. Nukleinsäuremolekül, das das Nukleinsäuremolekül aus einem der Ansprüche 5 bis 7 enthält.
9. Verwendung zumindest eines Nukleinsäuremoleküls aus einem der Ansprüche 5 bis 8 für diagnostische Zwecke, insbesondere zum Nachweis einer Erkrankung des Bewegungsapparates.
10. Verwendung zumindest eines Nukleinsäuremoleküls aus einem der Ansprüche 5 bis 8 zum Inhibieren oder Nachweis der Expression einer Protonenpumpe in Fibroblasten, Osteoblasten und/oder fibroblastenartigen Zellen.
11. Kit, das zumindest ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 5 bis 8 enthält.
12. Verwendung eines Mittels, das zum Nachweis der Expression einer Protonenpumpe in Fibroblasten, Osteoblasten und/oder fibroblastenartigen Zellen dient, in der Diagnose von Erkrankungen oder pathologischen Zuständen des Bewegungsapparates.

13. Diagnostisches Mittel zum Nachweis der pathologisch veränderten Expression einer Protonenpumpe in Fibroblasten, Osteoblasten und/oder fibroblastenartigen Zellen, das zumindest ein Nukleinsäuremolekül enthält, das mit einem Abschnitt eines für die Protonenpumpe kodierenden Genes hybridisiert.
14. Therapeutisches Mittel zur Inhibierung der Expression und/oder Funktion einer Protonenpumpe in Fibroblasten, Osteoblasten und/oder fibroblastenartigen Zellen, das zumindest ein Nukleinsäuremolekül enthält, das mit einem Abschnitt eines für die Protonenpumpe kodierenden Genes hybridisiert.

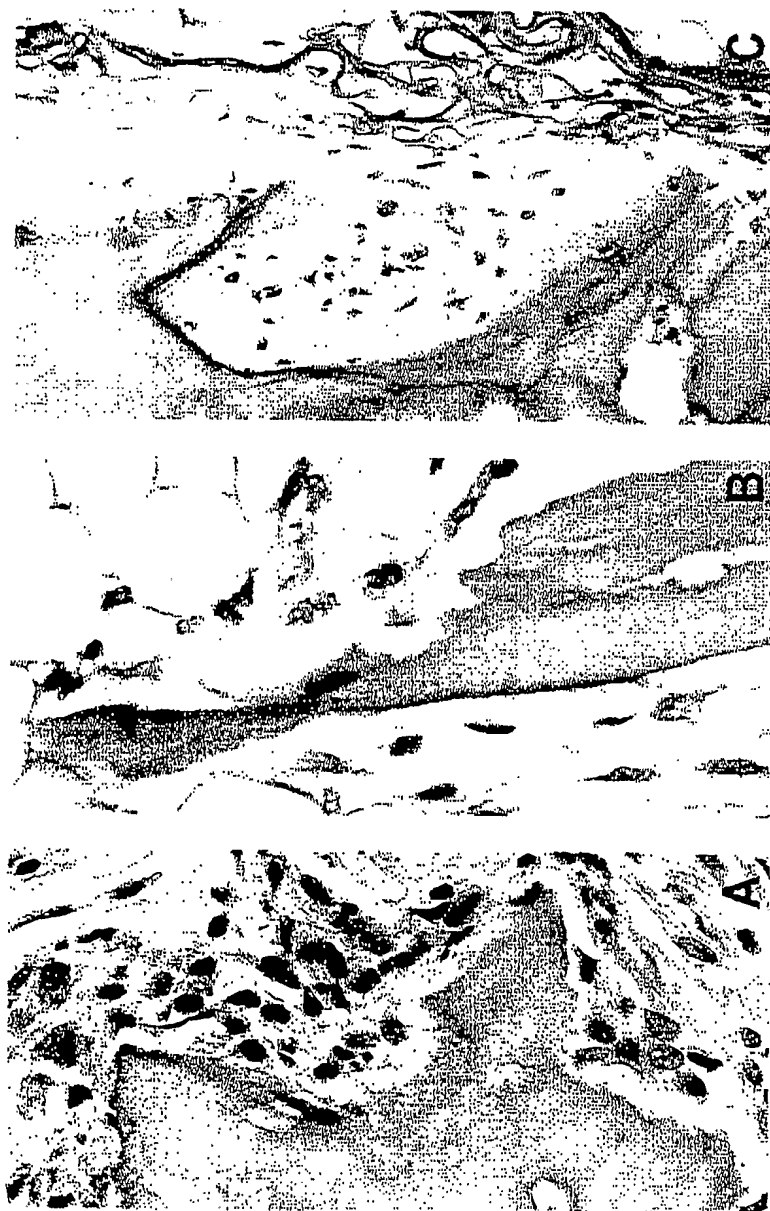
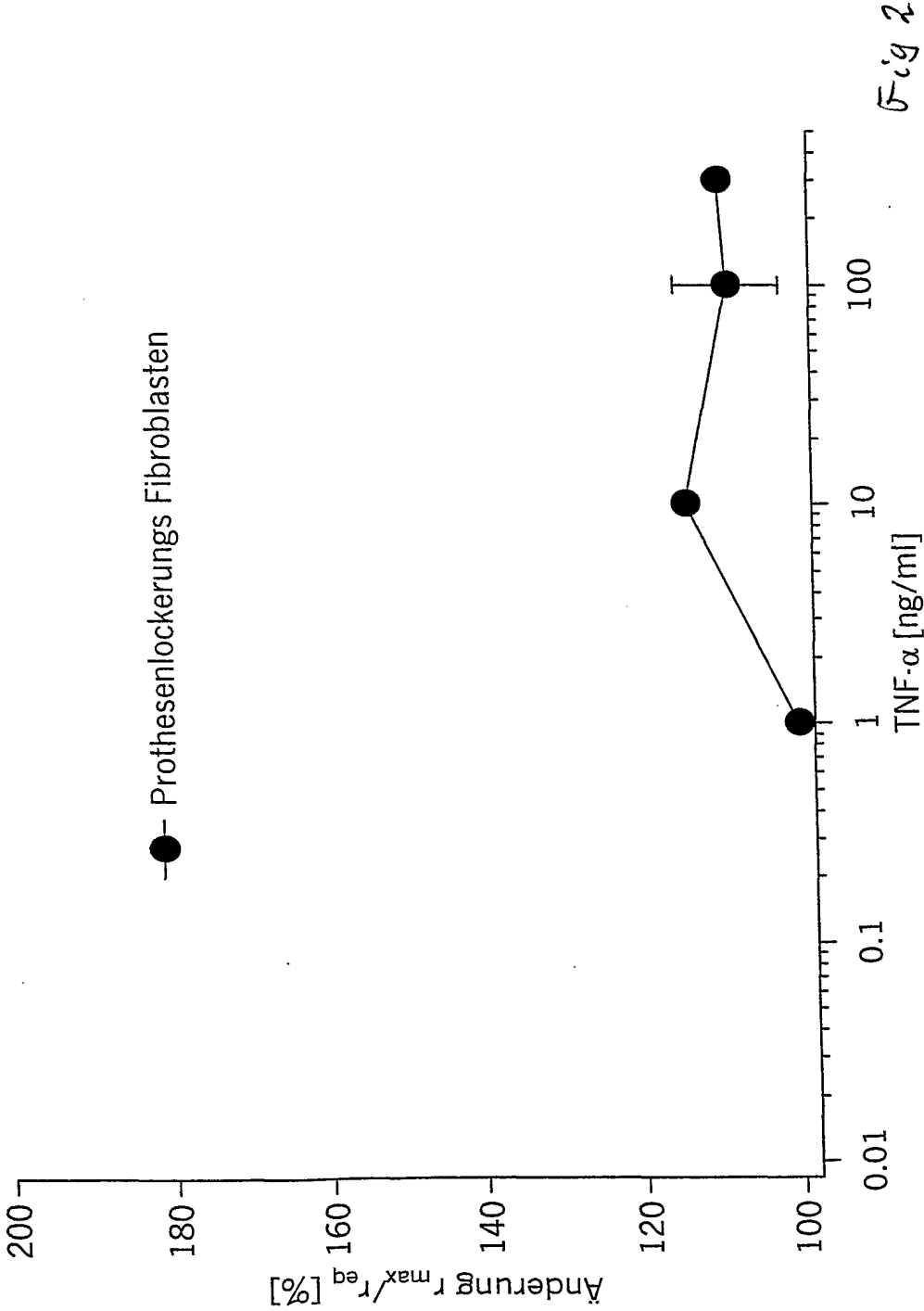
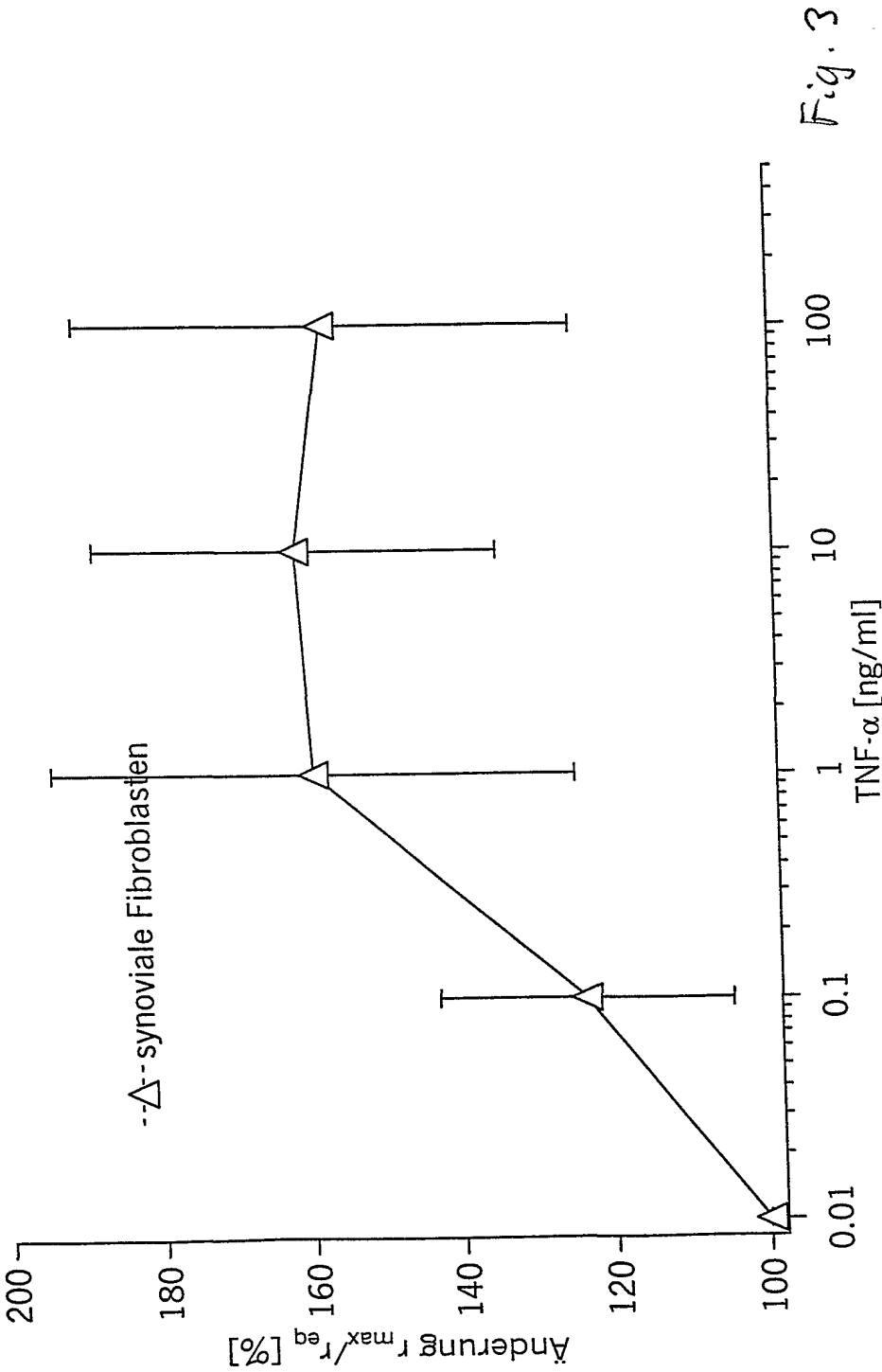
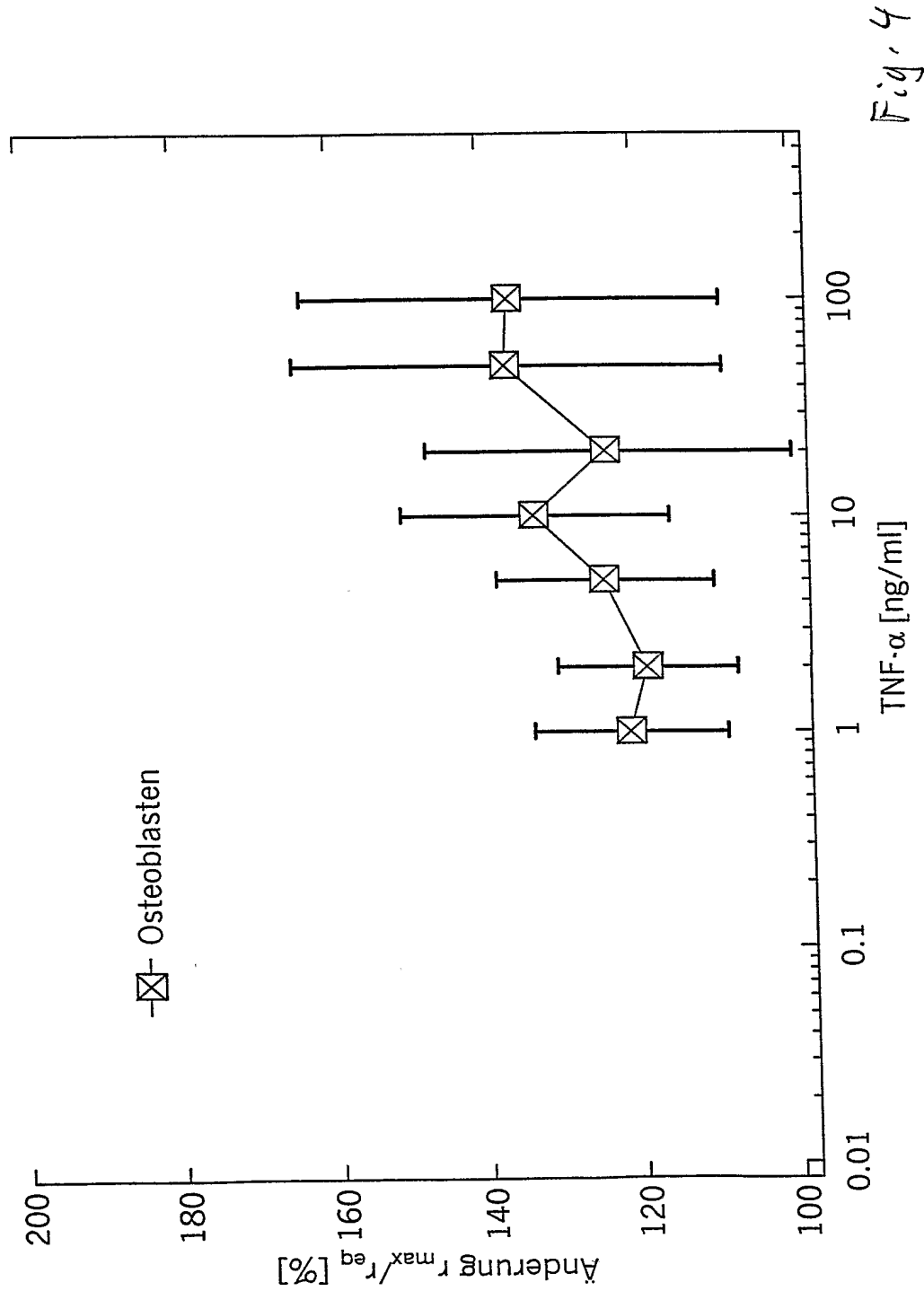


Fig. 1







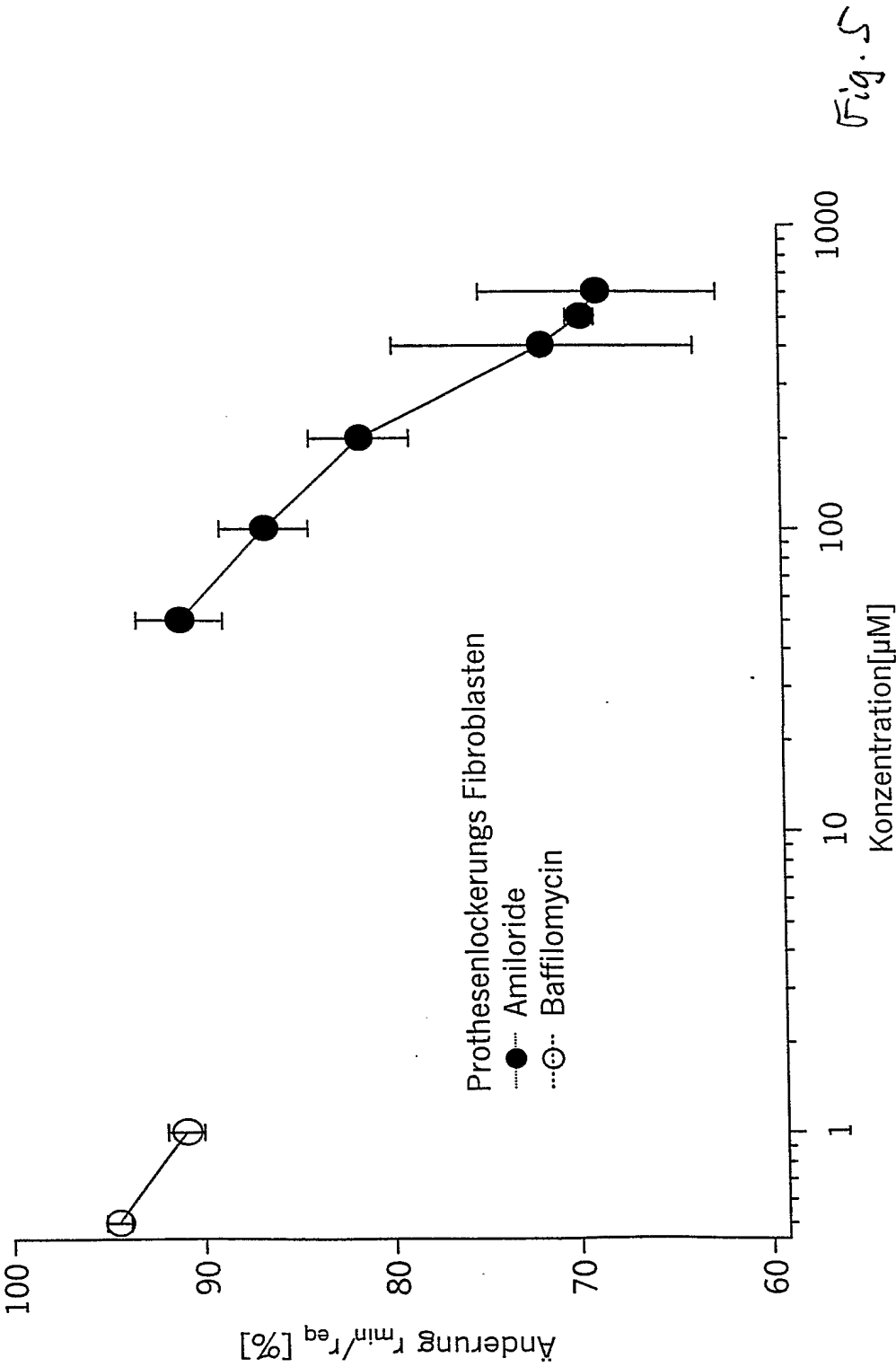
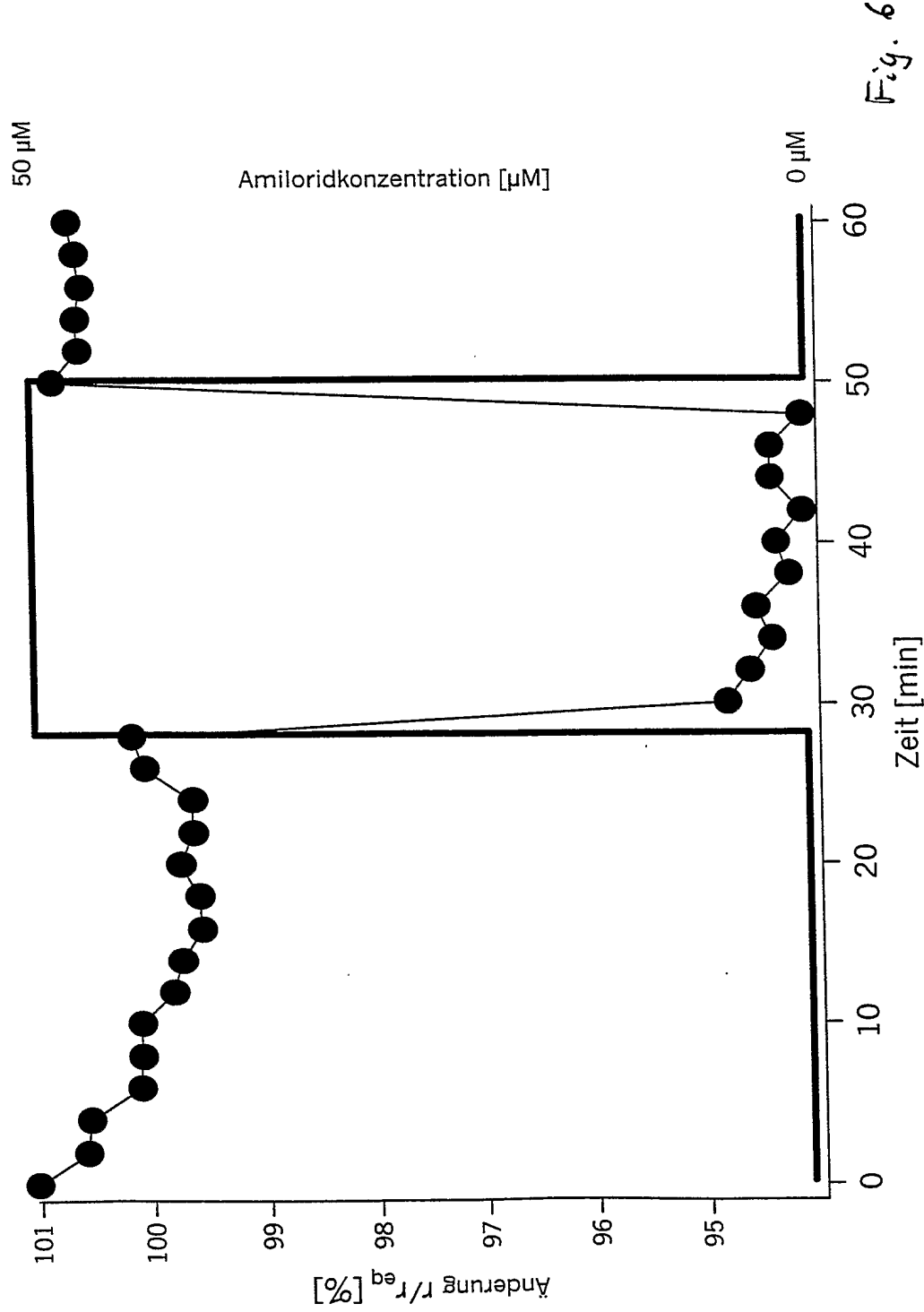


Fig. 5



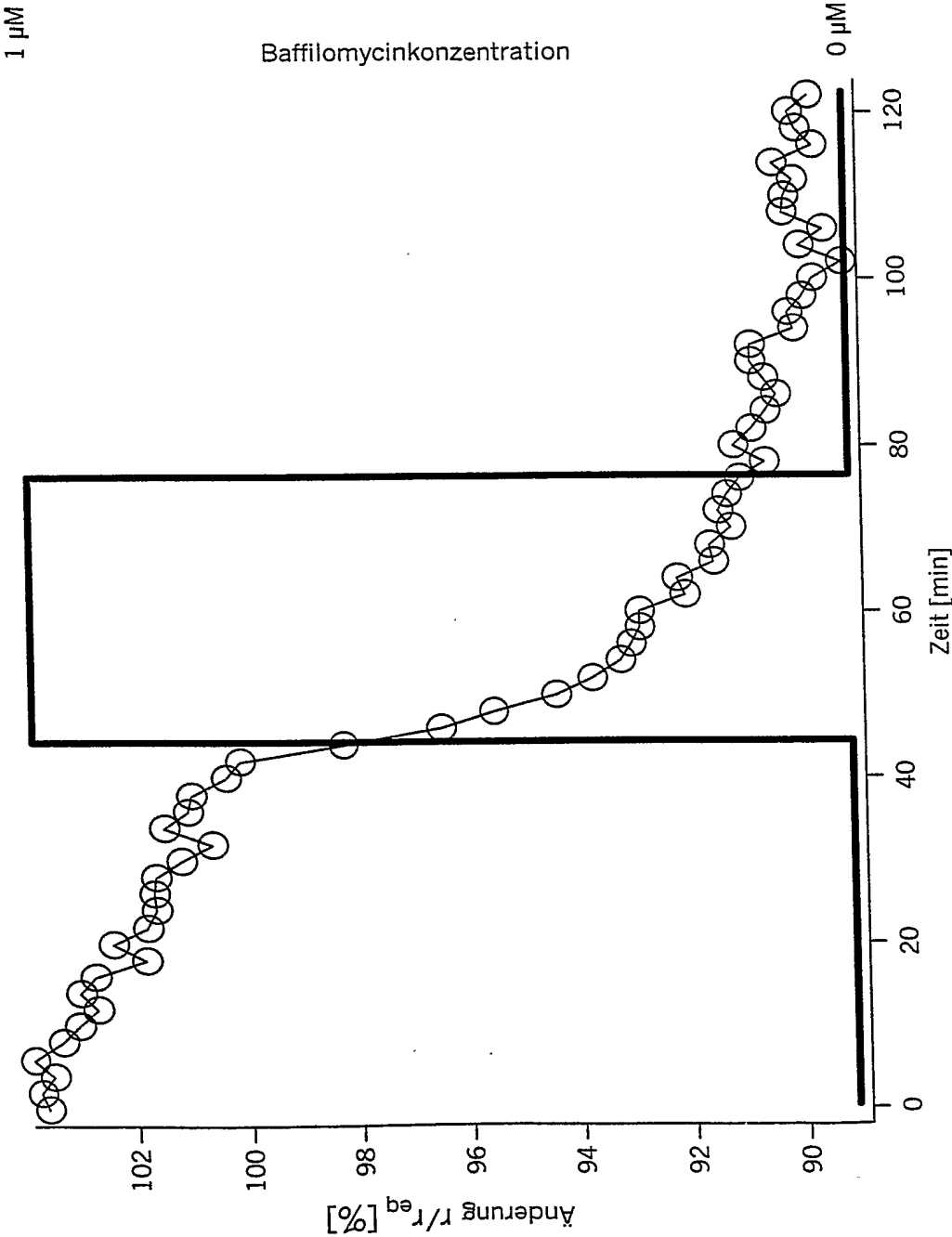


Fig 7

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Univ.Klinikum Tübingen

<120> Verwendung von Protonenpumpen-Hemmern

<130> 5402p190WO

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 1

tgactttgag

cagaatggaa

cc

22

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 2

ccctcgcggg

19

aatagaact